

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 septembre 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/64328 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : B01J 13/00,
B01F 17/00, A61K 9/51, B01J 13/06 (FR). PECH, Brigitte [FR/FR]; 6, rue Chaperonnière,
F-49100 Angers (FR). RICHARD, Joël [FR/FR]; La
Modtais - Blou, F-49160 Longue (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00621 (74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).
- (22) Date de dépôt international : 2 mars 2001 (02.03.2001)
- (25) Langue de dépôt : français (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
00/02688 2 mars 2000 (02.03.2000) FR (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
MAINELAB [FR/FR]; 8, rue André Boquel, Parc
Scientifique des Capucins, F-49100 Angers (FR). UNI-
VERSITE D'ANGERS [FR/FR]; 40, rue de Rennes,
F-49000 Angers (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HEUR-
TAULT, Béatrice [FR/FR]; 22 bis, rue de la Meignanne,
F-49100 Angers (FR). SAULNIER, Patrick [FR/FR]; 42,
rue de Milpied, F-49130 Les-Ponts-de-Cé (FR). BENOIT,
Jean-Pierre [FR/FR]; 45, allée des Châtaigniers, F-49240
Avrille (FR). PROUST, Jacques-Emile [FR/FR]; 3,
chemin des Amourettes, F-49170 Saint-Léger-des-Bois
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: LIPID NANOCAPSULES, PREPARATION METHOD AND USE AS MEDICINE

(54) Titre : NANOCAPSULES LIPIDIQUES, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATION COMME MEDICAMENT

(57) Abstract: The invention concerns nanocapsules, in particular with an average size less than 50 nm, consisting of an essentially lipid core liquid or semiliquid at room temperature, coated with an essentially lipid film solid at room temperature having a thickness of 2 - 10 nm. The invention also concerns a method for preparing same which consists in producing a reverse phase of an aqueous emulsion brought about by several temperature raising and lowering cycles. Said lipid nanocapsules are particularly designed for producing a medicine.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des nanocapsules, en particulier de taille moyenne inférieure à 50 nm, constituées d'un coeur essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante, enrobé d'un film essentiellement lipidique solide à température ambiante d'épaisseur 2 - 10 nm. Elle concerne également un procédé pour leur préparation qui consiste en l'inversion de phase d'une émulsion huile/eau provoquée par plusieurs cycles de montée et de descente en température. Les nanocapsules lipidiques de l'invention sont particulièrement destinées à la fabrication d'un médicament.

WO 01/64328 A1

BEST AVAILABLE COPY

NANOCAPSULES LIPIDIQUES, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATION COMME MEDICAMENT

5 La présente invention a pour objet des nanocapsules lipidiques, un procédé pour leur préparation et leur utilisation pour la fabrication d'un médicament, destiné notamment à être administré par voie injectable, orale ou nasale.

10 Ces dernières années, de nombreux groupes ont développé la formulation de nanoparticules solides lipidiques ou nanosphères lipidiques (Müller, R.H. et Mehnert, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1) : 62-69, 1995 ; W., Gasco, M.R., *Pharmaceutical Technology Europe* : 52-57, décembre 1997 ; EP 605 497). Il s'agit d'une alternative à l'utilisation des liposomes ou des particules polymères. Ces
15 particules lipidiques présentent l'avantage d'être formulées en l'absence de solvant. Elles ont permis d'encapsuler à la fois des produits lipophiles et hydrophiles sous forme de paires d'ions par exemple (Cavalli, R. et al, *S.T.P. Pharma Sciences*, 2(6) : 514-518, 1992 ; et Cavalli, R. et al, *International Journal of Pharmaceutics*, 117 : 243-246, 1995). Ces
20 particules peuvent être stables sur plusieurs années à l'abri de la lumière, à 8°C (Freitas, C. et Müller, R.H., *Journal of Microencapsulation*, 1 (16) : 59-71, 1999).

 Deux techniques sont couramment utilisées pour préparer des nanoparticules lipidiques :

- 25 - l'homogénéisation d'une émulsion chaude (Schwarz, C. et al, *Journal of Controlled Release*, 30 : 83-96, 1994 ; Müller, R.H. et al, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1) : 62-69, 1995) ou froide (Zur Mühlen, A. and Mehnert W., *Pharmazie*, 53 : 552-555, 1998 ; EP 605 497), ou
- 30 - la trempe d'une microémulsion en présence de co-tensioactifs tels que le butanol. La taille des nanoparticules obtenues est en général supérieure à 100 nm (Cavalli, R. et al, *European Journal of*

Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 43(2) : 110-115, 1996 ; Morel, S. et al, International Journal of Pharmaceutics, 132 : 259-261, 1996).

Cavalli et al. (International Journal of Pharmaceutics, 2(6) : 514-518, 1992 ; et Pharmazie, 53 : 392-396, 1998) décrivent l'utilisation d'un
5 sel biliaire, le taurodéoxycholate, non toxique par voie injectable pour la formation de nanosphères de taille supérieure ou égale à 55 nm.

La présente invention concerne des nanocapsules et non des nanosphères. On entend par nanocapsules des particules constituées d'un cœur liquide ou semi-liquide à température ambiante, enrobé d'un
10 film solide à température ambiante, par opposition à des nanosphères qui sont des particules matricielles, i.e. dont la totalité de la masse est solide. Lorsque les nanosphères contiennent un principe pharmaceutiquement actif, celui-ci est finement dispersé dans la matrice solide.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par température
15 ambiante, une température comprise entre 15 et 25°C.

La présente invention a pour objet des nanocapsules de taille moyenne inférieure à 150 nm, de préférence inférieure à 100 nm, de préférence encore inférieure à 50 nm. Les nanocapsules sont chacune constituées d'un cœur essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à
20 température ambiante, enrobé d'un film essentiellement lipidique solide à température ambiante.

Compte-tenu de leur taille, les nanocapsules de l'invention sont des particules lipidiques colloïdales.

L'indice de polydispersité des nanocapsules de l'invention est
25 avantageusement compris entre 5 et 15 %.

L'épaisseur du film solide est avantageusement comprise entre 2 à 10 nm. Elle est égale environ au dixième du diamètre des particules.

Le cœur des nanocapsules est essentiellement constitué d'un corps gras liquide ou semi-liquide à température ambiante, par exemple un
30 triglycéride ou un ester d'acide gras, représentant 20 à 60 %, préférentiellement 25 à 50 % en poids des nanocapsules.

Le film solide enrobant les nanocapsules est, de préférence, essentiellement constitué d'un tensio-actif lipophile, par exemple une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est comprise entre 40 et 80 %. Le film solide peut également contenir un tensio-actif hydrophile, par exemple le Solutol® HS 15.

Le tensio-actif hydrophile contenu dans le film solide enrobant les nanocapsules représente de préférence entre 2 à 10 % en poids des nanocapsules, de préférence 8 % environ.

Le triglycéride constituant le cœur des nanocapsules est notamment choisi parmi les triglycérides en C₈ à C₁₂, par exemple des triglycérides des acides capriques et capryliques et leurs mélanges.

L'ester d'acide gras est choisi parmi les esters d'acide gras en C₈ à C₁₈, par exemple le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle, et leurs mélanges. L'ester d'acide gras est de préférence en C₈ à C₁₂.

Les nanocapsules de l'invention sont particulièrement adaptées à la formulation de principes actifs pharmaceutiques. Dans ce cas, le tensio-actif lipophile peut être avantageusement solide à 20°C et liquide à 37°C environ.

La quantité de tensio-actif lipophile contenu dans le film solide enrobant les nanocapsules est fixée de telle sorte que le rapport massique corps gras liquide / composé tensio-actif solide est choisi entre 1 et 15, de préférence entre 1,5 et 13, plus préférentiellement entre 3 et 8.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des nanocapsules décrites précédemment.

Le procédé de l'invention est basé sur l'inversion de phase d'une émulsion huile/eau provoquée par plusieurs cycles de montée et de descente en température.

Le procédé de l'invention consiste à

- a) - préparer une émulsion huile/eau contenant une phase grasse huileuse, un tensio-actif hydrophile non ionique, un tensio-actif lipophile solide à 20°C, et éventuellement un principe

pharmaceutiquement actif, soluble ou dispersible en phase grasse huileuse, ou un principe pharmaceutiquement actif soluble ou dispersible en phase aqueuse.

5 - provoquer l'inversion de phase de ladite émulsion huile/eau par augmentation de la température jusqu'à une température T_2 supérieure à la température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau/huile, suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1 , $T_1 < TIP < T_2$.

10 - effectuer au moins un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 , jusqu'à observer une suspension translucide,

b) effectuer la trempe de l'émulsion huile/eau à une température voisine de T_1 , de préférence supérieure à T_1 , pour obtenir des nanocapsules stables.

15 Les nanocapsules obtenues selon le procédé de l'invention sont avantageusement dépourvues d'agents co-tensio-actifs, comme les alcools en $C_1 - C_4$.

Le nombre de cycles appliqués à l'émulsion dépend de la quantité d'énergie nécessaire pour former les nanocapsules.

20 L'inversion de phase peut être visualisée par l'annulation de la conductivité de la formulation lorsque l'émulsion eau/huile se forme.

Le procédé de l'invention comprend deux étapes.

25 La première étape consiste à peser l'ensemble des constituants, à les chauffer au delà d'une température T_2 sous agitation douce (par exemple magnétique) puis éventuellement à les refroidir à une température T_1 ($T_1 < T_2$). Après un certain nombre de cycles de température, on obtient une émulsion eau/huile.

30 L'inversion de phase entre l'émulsion huile/eau et l'émulsion eau/huile se traduit par une diminution de la conductivité quand la température augmente jusqu'à ce qu'elle s'annule. La température moyenne de la zone d'inversion de phase correspond à la température d'inversion de phase (TIP). L'organisation du système sous forme de

nanocapsules se traduit visuellement par un changement d'aspect du système initial qui passe de blanc-opaque à blanc-translucide. Ce changement se produit à une température inférieure à la TIP. Cette température est située généralement entre 6 à 15°C en dessous de la TIP.

5 T_1 est une température à laquelle la conductivité est au moins égale à 90 – 95 % de la conductivité mesurée à 20°C.

T_2 est la température à laquelle la conductivité s'annule.

La deuxième étape consiste en un refroidissement brusque (ou trempe) de l'émulsion huile/eau à une température voisine de T_1 , de
10 préférence supérieure à T_1 , sous agitation magnétique, en la diluant entre 3 et 10 fois à l'aide d'eau désionisée à 2°C +/- 1°C jetée dans l'émulsion fine. Les particules obtenues sont maintenues sous agitation pendant 5 min.

Dans un mode de réalisation préférée, la phase grasse est un
15 triglycéride d'acide gras, le tensio-actif lipophile solide est une lécithine et le tensio-actif hydrophile est le Solutol® HS15. Dans ces conditions, $T_1 = 60^\circ\text{C}$; $T_2 = 85^\circ\text{C}$ et le nombre de cycles est égal à 3.

Le rapport corps liquide / composé tensio-actif solide est choisi
entre 1 et 15, de préférence entre 1,5 et 13, plus préférentiellement entre
20 3 et 8.

L'émulsion huile/eau contient avantageusement 1 à 3 % de tensio-actif lipophile, 5 à 15 % de tensio-actif hydrophile, 5 à 15 % de corps gras huileux, 64 à 89 % d'eau (les pourcentages sont exprimés en poids).

Plus l'indice HLB du corps gras liquide est élevé, plus la
25 température d'inversion de phase est élevée. En revanche, la valeur de l'indice HLB du corps gras ne semble pas avoir d'influence sur la taille des nanocapsules.

Ainsi, lorsque la taille des groupements terminaux des triglycérides augmente, leur indice HLB diminue et la température d'inversion de phase
30 diminue.

L'indice HLB ou balance hydrophile-lipophile est tel que défini par C. Larpent dans le Traité K.342 des Editions TECHNIQUES DE L'INGENIEUR.

5 La taille des particules diminue quand la proportion en agent tensio-actif hydrophile augmente et quand la proportion en agents tensio-actifs (hydrophile et lipophile) augmente. En effet, l'agent tensio-actif entraîne une diminution de la tension interfaciale et donc une stabilisation du système ce qui favorise l'obtention de petites particules.

10 Par ailleurs, la taille des particules augmente quand la proportion d'huile augmente.

Selon un mode de réalisation préférée, la phase grasse est le Labrafac® WL 1349, le tensio-actif lipophile est le Lipoïd® S 75-3 et le tensio-actif hydrophile non ionique est le Solutol® HS 15. Ces composés présentent les caractéristiques suivantes :

15 - Le Labrafac® lipophile WL1349 (Gattefossé, Saint-Priest, France). Il s'agit d'une huile composée de triglycérides à chaîne moyenne des acides capryliques et capriques (C_8 et C_{10}). Sa densité est de 0,930 à 0,960 à 20°C. Son indice HLB est de l'ordre de 1.

20 - Le Lipoïd® S 75-3 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Allemagne). Le Lipoïd® S 75-3 correspond à de la lécithine de soja. Cette dernière contient environ 69 % de phosphatidylcholine et 9 % de phosphatidyl éthanolamine. Ce sont donc des composés tensio-actifs. Ce constituant est le seul constituant solide à 37°C et à température ambiante dans la formulation. Il est couramment utilisé pour la formulation de particules
25 injectables.

- Le Solutol® HS 15 (BASF, Ludwigshafen, Allemagne). Il s'agit d'un 2-hydroxystéarate de polyéthylèneglycol-660. Il joue donc le rôle d'agent tensio-actif hydrophile non ionique dans la formulation. Il est utilisable par voie injectable (chez la souris en IV $DL_{50} > 3,16$ g/kg, chez le rat $1,0 < DL$
30 $50 < 1,47$ g /kg).

La phase aqueuse de l'émulsion huile/eau peut également contenir 1 à 4 % d'un sel comme le chlorure de sodium. La modification de la concentration en sel entraîne un déplacement de la zone d'inversion de phase. Plus la concentration en sel augmente et plus la température d'inversion de phase est basse. Ce phénomène sera intéressant pour l'encapsulation de principes actifs thermosensibles hydrophobes. Leur incorporation pourra se faire à une température plus faible.

Les nanocapsules de l'invention peuvent avantageusement contenir un principe actif et entrer dans la composition d'un médicament destiné à être administré par voie injectable, notamment intra-veineuse, par voie orale ou par voie nasale.

Lorsque le principe actif est peu soluble dans la phase huileuse, on ajoute un co-solvant, par exemple la N,N-diméthylacétamide.

Les nanocapsules de l'invention conviennent plus particulièrement pour l'administration des principes actifs suivants :

- les anti-infectieux parmi lesquels les antimycosiques, les antibiotiques,
- les anticancéreux,
- les principes actifs destinés au Système Nerveux Central qui doivent passer la barrière hémato-encéphalique, tels que les antiparkinsoniens et plus généralement les principes actifs pour traiter les maladies neurodégénératives.

Le principe pharmaceutiquement actif peut être tout d'abord soluble ou dispersible en phase grasse huileuse, et dans ce cas, il sera incorporé dans le cœur de la nanocapsule. Pour ce faire, il est incorporé au stade de la première étape de préparation de l'émulsion huile/eau qui contient en outre, la phase grasse huileuse, un tensio-actif hydrophile non-ionique et un tensio-actif lipophile solide à 20°C.

Le principe pharmaceutiquement actif peut également être de nature hydrosoluble ou dispersible en phase aqueuse, et dans pareil cas, il ne sera fixé à la surface des nanocapsules qu'à l'issue de la phase ultime de préparation des nanocapsules stables. Un tel principe actif

hydrosoluble peut être de toute nature, y compris les protéines, les peptides, les oligonucléotides et les plasmides ADN. Un tel principe actif est fixé à la surface des nanocapsules par introduction dudit principe actif dans la solution au sein de laquelle se trouvent dispersées les nanocapsules stables obtenues à l'issue du procédé selon l'invention. La présence d'un agent tensio-actif hydrophile non-ionique favorise les liaisons d'interaction entre le principe actif hydrosoluble et la surface libre des nanocapsules.

Le principe actif hydrosoluble pourra également être introduit dans la phase aqueuse lors de la première étape de préparation initiale huile/eau.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants en référence aux figures 1 à 4.

La figure 1 est une photographie des nanocapsules de l'invention obtenues dans l'exemple 1. L'échelle est de 1 cm pour 50 nm.

La figure 2 représente l'évolution de la taille moyenne des particules en fonction de la proportion en agent tensio-actif hydrophile (Solutol®).

La figure 3 représente l'évolution de la conductivité en fonction de la température pour différentes concentrations en sel. Dans la courbe 1, la concentration en sel est de 2,0 % en poids. Dans la courbe 2, la concentration est de 3,4 % en poids.

La figure 4 représente l'évolution de la conductivité d'une émulsion huile/eau (H/E) décrite dans l'exemple 1, en fonction de la température après trois cycles de montée et descente en température entre 60 et 85°C.

Exemple 1 : Nanocapsules non chargées en principe actif**A) Préparation des nanocapsules**

5 On réalise 5 g d'une émulsion contenant 75 mg de Lipoïd® S75-3, 504 mg de Labrafac® WL 1349 lipophile, 504 mg de Solutol® HS 15, 3,829 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium.

 L'ensemble est réuni dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température
10 de 85°C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60°C. Ce cycle (entre 85°C et 60°C) est réalisé jusqu'à ce que l'on observe l'annulation de la conductivité en fonction de la température (figure 4). L'inversion de phase se produit au bout de trois cycles. Au dernier refroidissement, on effectue une trempe
15 en jetant 12,5 ml d'eau distillée à 2°C +/- 1°C sur le mélange à 70°C. Le système est alors maintenu sous agitation magnétique pendant 5 min.

 Les particules obtenues dans les conditions précédemment décrites, après trois cycles de température, ont une taille moyenne de 43 +/- 7 nm. Leur polydispersité de taille est de 0,071. La microscopie
20 électronique à transmission en utilisant l'acide phosphotungstique nous a permis de mettre en évidence des particules de taille moyenne de l'ordre de 50 nm (voir figure 1). Par ailleurs, une observation faite en microscopie de force atomique en mode contact (appareillage Park Scientific Instruments, Genève, Suisse) montre que les nanocapsules sont
25 effectivement solides à la température de 25°C.

B) Modification des proportions d'agent tensio-actif hydrophile

 Le tableau I ci-dessous présente différentes formulations de
30 nanocapsules préparées avec des concentrations variables en tensio-actif hydrophile.

	% massique							
Lipoïd® S75-3	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51
Labrafac® WL 1349	10,08	10,08	10,08	10,08	10,08	10,08	10,08	10,08
Solutol® HS 15	5,00	7,50	10,08	15,00	20,00	22,50	25,00	30,00
Eau	81,65	79,10	76,60	71,68	66,68	64,18	61,68	56,68
NaCl	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76

TABLEAU I

La diminution de la concentration en Solutol® HS 15 entraîne une augmentation de la taille moyenne des particules (figure 2). On observe alors des tailles moyennes qui vont de 23 à 128 nm pour des proportions de Solutol® allant de 30 à 5 % de la formulation totale respectivement. La taille dépend donc de la concentration en agent tensioactif hydrophile.

10 C) Modifications des proportions d'agents tensio-actifs Lipoïd® et Solutol®

Le tableau II ci-dessous présente des formulations de nanocapsules préparées avec différentes concentrations d'agents tensio-actifs.

15

20

	% massique		
	A	B	C
Lipoïd® S75-3	0,78 %	1,51 %	2,35 %
Labrafac® WL 1349	10,08 %	10,08 %	10,08 %
Solutol® HS 15	5,22 %	10,08 %	15,65 %
Eau	82,16 %	76,60 %	10,16 %
NaCl	1,76 %	1,76 %	1,76 %
Proportion en agents tensio-actifs	6,00 %	11,59 %	18,00 %

TABLEAU II

L'augmentation de la proportion d'agents tensioactifs dans la formulation entraîne une diminution de la taille moyenne. En effet, la formulation A permet d'obtenir des particules de taille moyenne 85 +/- 7 nm (P = 0,124). Pour les formulations B et C les tailles moyennes deviennent 43 +/- 7 nm (P = 0,071), et 29 +/- 8 nm (P = 0,148) respectivement.

10 D) Modification de la concentration en NaCl

Le tableau III ci-dessous présente deux formulations de nanocapsules préparées avec deux concentrations en sel NaCl différentes.

	% massique	
Lipoïd® S75-3	1,73 %	1,70 %
Labrafac® WL 1349	5,76 %	2,84 %
Solutol® HS15	2,88 %	5,68 %
Eau	87,61 %	86,36 %
NaCl	2,02 %	3,40 %

TABLEAU III

La modification de la concentration en sel entraîne un déplacement de la zone d'inversion de phase. Plus la concentration en sel augmente et plus la température d'inversion de phase est basse (figure 3). Ce phénomène sera intéressant pour l'encapsulation de principes actifs thermosensibles hydrophobes. Leur incorporation pourra se faire à une température plus faible.

Ces formulations permettent d'obtenir des particules de taille similaire aux tailles précédentes malgré les concentrations en sel différentes.

Exemple 2 : Encapsulation d'un principe actif lipophile, le Soudan III

La formulation correspond à celle de l'exemple 1 : on réalise 5 g de l'émulsion initiale en pesant 75 mg de Lipoïd® S75-3, 504 mg de Labrafac® lipophile et 504 mg de Solutol®, 3,829 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium. On ajoute 200 mg de Soudan III solubilisé dans de l'huile de vaseline. L'ensemble est pesé dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température de 85°C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60°C. Ce cycle (entre 85°C et 60°C) est réalisé trois fois. Au dernier refroidissement on effectue une trempe à 70°C en jetant 12,5 ml d'eau distillée à 2°C +/- 1°C. Le système est alors maintenu sous agitation magnétique pendant 5 min.

L'encapsulation de Soudan III nous a permis d'obtenir des particules de taille similaire aux particules de l'exemple 1, pour les mêmes proportions de tensioactifs et de phase grasse, soit 45 +/- 12 nm (P = 0,138). A l'œil nu, l'échantillon apparaît rose homogène.

Exemple 3 : Encapsulation de la progestérone.

La formulation correspond à celle de l'exemple 1 : on réalise 5 g de l'émulsion initiale en pesant 75 mg de Lipoïd® S75-3, 504 mg de Labrafac® lipophile et 504 mg de Solutol®, 3,829 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium. On ajoute 10 mg de progestérone. L'ensemble est pesé dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température de 85°C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60°C. Ce cycle (entre 85°C et 60°C) est réalisé trois fois. Au dernier refroidissement, on effectue une trempe à 70°C en jetant 12,5 ml d'eau distillée à 2°C +/- 1°C. Le système est alors maintenu sous agitation magnétique pendant 5 min.

L'encapsulation de progestérone permet d'obtenir des particules de tailles similaires aux particules de l'exemple 1, à savoir 45 +/- 12 nm (P = 0,112). La progestérone n'est pas retrouvée dans la phase aqueuse à une concentration supérieure à sa solubilité. En effet, une centrifugation à 200000 tr/min pendant 30 minutes permet d'obtenir un léger précipité dont la composition a été étudiée par DSC. Ce précipité ne contient pas de progestérone. La progestérone étant quasiment insoluble dans l'eau, cela indique une incorporation du principe actif dans les nanocapsules.

Exemple 4 : Encapsulation d'une suspension de busulfan**25 A) Suspension de busulfan (à une concentration de 0,25 mg/ml)**

La première étape de l'encapsulation de busulfan consiste à solubiliser celui-ci dans de la N,N-diméthyl-acétamide. On réalise donc une solution à 24 mg de busulfan par mL de N,N diméthyl acétamide. On prélève 175 mg de cette solution que l'on ajoute aux 504 mg de Labrafac®. On pèse également 75 mg de Lipoïd® S75-3, 504 mg de

- Solutol[®], 3,829 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium. L'émulsion initiale est donc à une concentration de 0,88 mg/g d'émulsion. L'ensemble est réuni dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température de 85°C.
- 5 Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60°C. Ce cycle (entre 85°C et 60°C) est réalisé trois fois. Au dernier refroidissement, on effectue une trempe à 70°C en jetant 12,5 ml d'eau distillée à 2°C +/- 1°C. Le système est alors maintenu sous agitation magnétique pendant 5 min. La concentration finale, c'est-à-dire
- 10 après trempe donc dilution, est de 0,25 mg/ ml.

La taille des particules obtenues est légèrement supérieure à celle de l'exemple 1 en raison de la proportion plus importante de phase grasse (63 +/- 5 nm). Comme pour la progestérone, le busulfan n'est pas retrouvé dans la phase aqueuse à une concentration supérieure à sa solubilité. En

15 effet, aucun cristal n'est visible par microscopie optique dans la phase aqueuse après encapsulation. Or, le busulfan étant quasiment insoluble dans l'eau, cela indique une incorporation du busulfan dans les nanocapsules.

20 **B) Suspension de busulfan (à une concentration de 0,50 mg/ml)**

- Une suspension de particules à 0,50 mg/l est préparée dans les mêmes conditions que précédemment après avoir solubilisé 50 mg de busulfan dans 1 ml de N,N-diméthyl-acétamide. On prélève 175 mg de
- 25 cette solution que l'on ajoute aux 504 mg de Labrafac[®]. On pèse également 75 mg de Lipoïd[®] S75-3, 504 mg de Solutol[®], 3,829 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium. L'émulsion initiale est donc à une concentration de 1,76 mg/ml d'émulsion. L'ensemble est réuni dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est
- 30 appliqué jusqu'à atteindre une température de 85°C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une

température de 60°C. Ce cycle (entre 85°C et 60°C) est réalisé trois fois. Au dernier refroidissement, on effectue une trempe à 70°C en jetant 12,5 ml d'eau distillée à 2°C +/- 1°C. Le système est alors maintenu sous agitation magnétique pendant 5 min. La concentration finale, c'est-à-dire

5 après trempage donc dilution, est de 0,50 mg / ml.

Exemple 5 : Influence de la nature du corps gras sur la température d'inversion de phase

10 On compare le Labrafac®, huile composée de triglycérides des acides capriques et capryliques, avec des esters d'acides gras. On a pu mettre en évidence l'importance de la taille de leurs groupements terminaux sur la température d'inversion de phase. On observe une

15 augmentation de la température d'inversion de phase avec une augmentation de la taille des groupements. Ainsi, dans la série des myristates, le changement d'aspect est visible à 69,5°C pour l'ester éthylique, à 71,5°C pour l'ester isopropylique et à 86,5°C pour l'ester octyldodécylique. Cette augmentation signifie que nous obtenons plus

20 facilement une émulsion huile dans eau lorsque l'huile possède un indice HLB plus faible (plus lipophile). En effet, ce caractère lipophile plus marqué entraîne une accentuation des liaisons hydrophobes entre l'agent tensio-actif et l'huile, et il faut donc plus d'énergie pour inverser ce système. Par ailleurs, la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras

25 n'influence pas la taille des particules, ni la température d'inversion de phase (entre C₁₄ et C₁₈). Il semble cependant que la double liaison présente dans l'oléate d'éthyle augmente sensiblement la température d'inversion de phase.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Huiles	Nb de carbone (AcGras)	Doubles liaisons	T° changement d'aspect (°C)	Taille des particules (nm)
Labrafac® lipophile	8/10	0	77,0	43 ± 7
Palmitate d'éthyle	16	0	69,0	37 ± 15
Oléate d'éthyle	18	1	71,5	41 ± 5
Myristate d'éthyle	14	0	69,5	35 ± 13
Myristate d'isopropyle	14	0	71,5	44 ± 23
Myristate d'octyl dodécyle	14	0	86,5	42 ± 16

TABLEAU IV

La valeur du HLB du corps gras ne semble pas affecter la taille des particules de manière significative.

5

Exemple 6: Influence de la nature du tensio-actif lipophile sur la taille des nanocapsules

Différents types de lécithine dont les proportions en phosphatidylcholine varient de 40 à 90 % ont été utilisés. La taille moyenne des particules augmente avec la teneur en phosphatidylcholine dans la lécithine (tableau V ci-dessous). En effet, pour 40 % de phosphatidylcholine, la taille des nanocapsules est de 35 +/- 8 nm tandis qu'elle est respectivement de 43 +/- 7 nm et 78 +/- 12 nm pour une proportion de 75 et 90 % de phosphatidylcholine dans la lécithine. En

10

15

revanche, l'utilisation de molécules chargées n'a pas permis d'obtenir des nanocapsules.

Type de Lipoïd	% de phosphatidylcholine	Taille moyenne des particules (nm)
Lipoïd® S45	40	35 ± 8
Lipoïd® S75-3	69	43 ± 7
Lipoïd® S100	90	78 ± 12
Lipoïd® EPC	98	61 ± 12
Lipoïd® E80	80	72 ± 18

TABLEAU V

5

Exemple 7 : Nanocapsules lipidiques présentant un principe actif hydrosoluble fixé à leur surface.

10

On prépare 500 mg d'une dispersion de nanocapsules lipidiques non chargées en principe actif, telles que décrites dans l'exemple 1, en utilisant la formulation suivante :

- 15
- Lipoïd® S 75-3 : 1,51 % massique
 - Labrafac® W1.1349 : 10,08 % massique
 - Solutol® HS15 : 10,08 % massique
 - Eau : 76,6 % massique
 - NaCl : 1,76 % massique

20

Les nanocapsules lipidiques obtenues présentent une taille de 43 ± 7 nm. 50 mg de la dispersion de nanocapsules lipidiques obtenues sont dilués dans 1 ml d'eau et incubés sous agitation douce avec une solution aqueuse contenant 50 µg d'ADN (pSV β-galactosidase, Promega, France)

pendant une heure en présence d'un mélange d'histones issues de thymus de veau (Boehringer Mannheim, Allemagne). On obtient des nanocapsules lipidiques présentant des molécules d'ADN condensées avec les protéines, adsorbées à leur surface.

REVENDICATIONS

1. Nanocapsules de taille moyenne inférieure à 150 nm, de préférence inférieure à 100 nm, de préférence encore inférieure à 50 nm, constituées d'un cœur essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante, enrobé d'un film essentiellement lipidique solide à température ambiante.
2. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 1, caractérisées en ce que leur indice de polydispersité est compris entre 5 et 15 %.
3. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que l'épaisseur du film solide est comprise entre 2 et 10 nm.
4. Nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que le cœur des nanocapsules est essentiellement constitué d'un corps gras, tel qu'un triglycéride ou un ester d'acide gras, représentant 20 à 60 %, de préférence 25 à 50 % en poids des nanocapsules.
5. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 4, caractérisées en ce que le triglycéride constituant le cœur des nanocapsules est choisi parmi les triglycérides en C₈ à C₁₂, par exemple des triglycérides des acides capriques et capryliques et leurs mélanges.
6. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 4, caractérisées en ce que l'ester d'acide gras constituant le cœur des nanocapsules est choisi parmi les esters d'acide gras en C₈ à C₁₈, par exemple le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle, et leurs mélanges.

7. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 6, caractérisées en ce que l'ester d'acide gras est en C_8 à C_{12} .
- 5 8. Nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que le film solide est essentiellement constitué d'un tensio-actif lipophile.
- 10 9. Nanocapsules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le rapport corps gras / composé tensio-actif lipophile est choisi entre 1 et 15, de préférence entre 1,5 et 13, plus préférentiellement entre 3 et 8.
- 15 10. Nanocapsules lipidiques selon la revendication 8 ou 9, caractérisées en ce que le tensio-actif lipophile est une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est comprise entre 40 et 90 %.
- 20 11. Nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisées en ce que le film solide contient en outre un tensio-actif hydrophile non ionique par exemple le Solutol[®] HS 15 représentant 2 à 10 % en poids des nanocapsules.
- 25 12. Nanocapsules lipidiques selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisées en ce que qu'elles contiennent un principe pharmaceutiquement actif.
- 30 13. Procédé de préparation de nanocapsules, qui implique les opérations consistant à :
 - a) - préparer une émulsion huile/eau contenant une phase grasse huileuse, un tensio-actif hydrophile non ionique, un tensio-actif lipophile solide à 20°C, et éventuellement un principe pharmaceutiquement actif soluble ou dispersible en phase grasse huileuse, ou un principe pharmaceutiquement actif soluble ou dispersible en phase aqueuse.

- 5 - provoquer l'inversion de phase de ladite émulsion huile/eau par augmentation de la température jusqu'à une température T_2 supérieure à la température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau/huile, suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1 , $T_1 < TIP < T_2$.
- effectuer au moins un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 , jusqu'à observer une suspension translucide,
- 10 b) effectuer la trempe de l'émulsion huile/eau à une température voisine de T_1 , de préférence supérieure à T_1 , pour obtenir des nanocapsules stables.
- 15 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la phase grasse huileuse est un triglycéride en C_8 à C_{12} , par exemple des triglycérides des acides capriques et capryliques et leurs mélanges ou un ester d'acide gras en C_8 à C_{18} , par exemple le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle, et leurs mélanges.
- 20 15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que le tensio-actif hydrophile non ionique est le Solutol® HS 15.
- 25 16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que le tensio-actif lipophile est une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est comprise entre 40 et 90 %, par exemple le Labrafac® WL 1349.
- 30 17. Procédé selon l'une des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que l'émulsion huile/eau contient :
- 1 à 3 % de tensio-actif lipophile,
- 5 à 15 % de tensio-actif hydrophile,

5 à 15 % de corps gras huileux,
64 à 89 % d'eau,
les pourcentages étant exprimés en poids.

- 5 18. Procédé selon l'une des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que l'émulsion huile/eau contient en outre de 1 à 4 % d'un sel, tel que le chlorure de sodium.
- 10 19. Procédé selon l'une des revendications 13 à 18, caractérisé en ce que le tensio-actif lipophile est solide à 37°C.
- 15 20. Procédé de préparation de nanocapsules selon l'une des revendications 13 à 19, caractérisé en ce qu'un principe pharmaceutiquement actif hydrosoluble est adsorbé à la surface libre des nanocapsules stables obtenues à l'issue de l'étape b).
- 20 21. Utilisation des nanocapsules selon l'une des revendications 1 à 12, pour la fabrication d'un médicament administré par voie injectable, notamment intraveineuse, par voie orale ou par voie nasale.

1 / 2

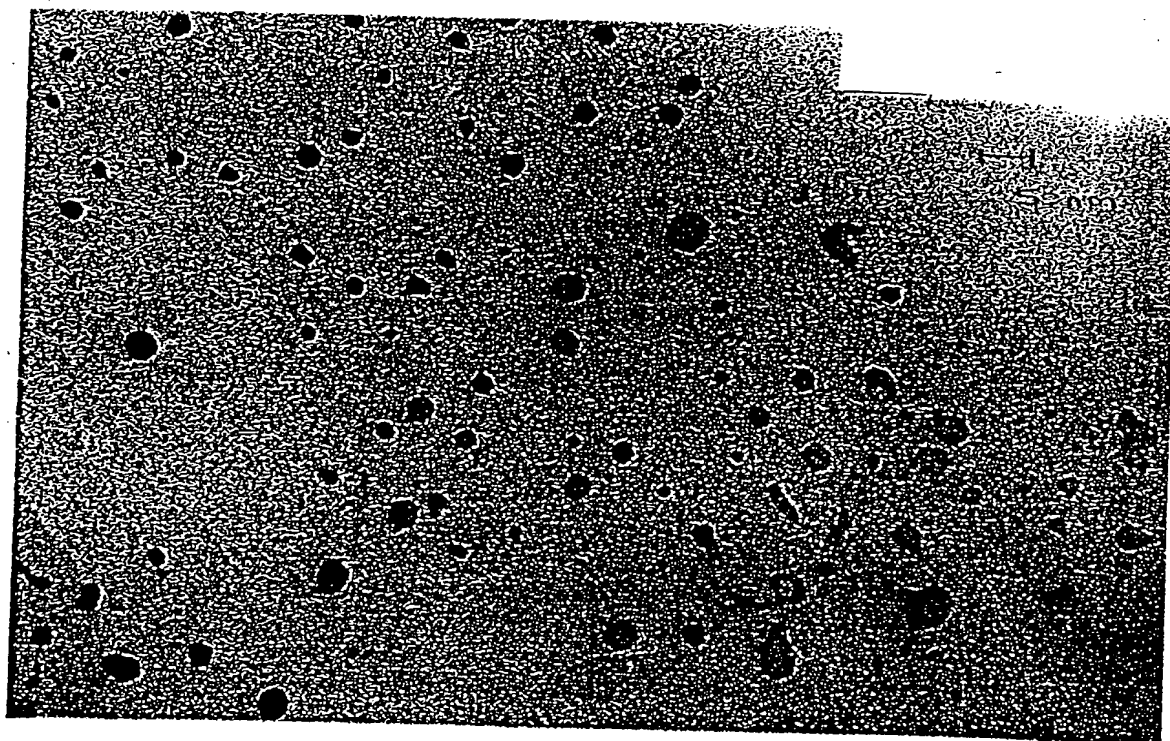


FIGURE 1

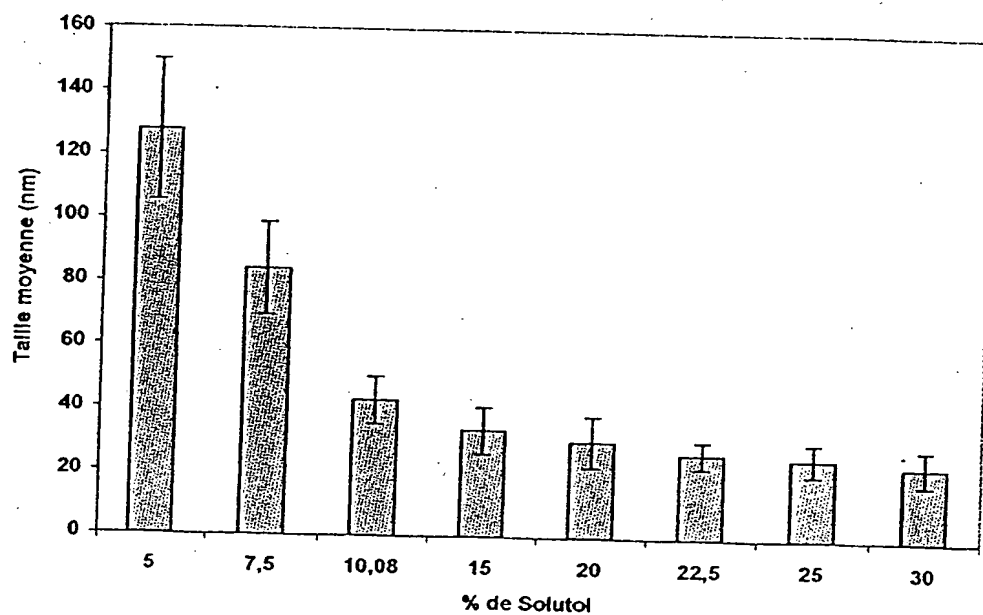


FIGURE 2

2 / 2

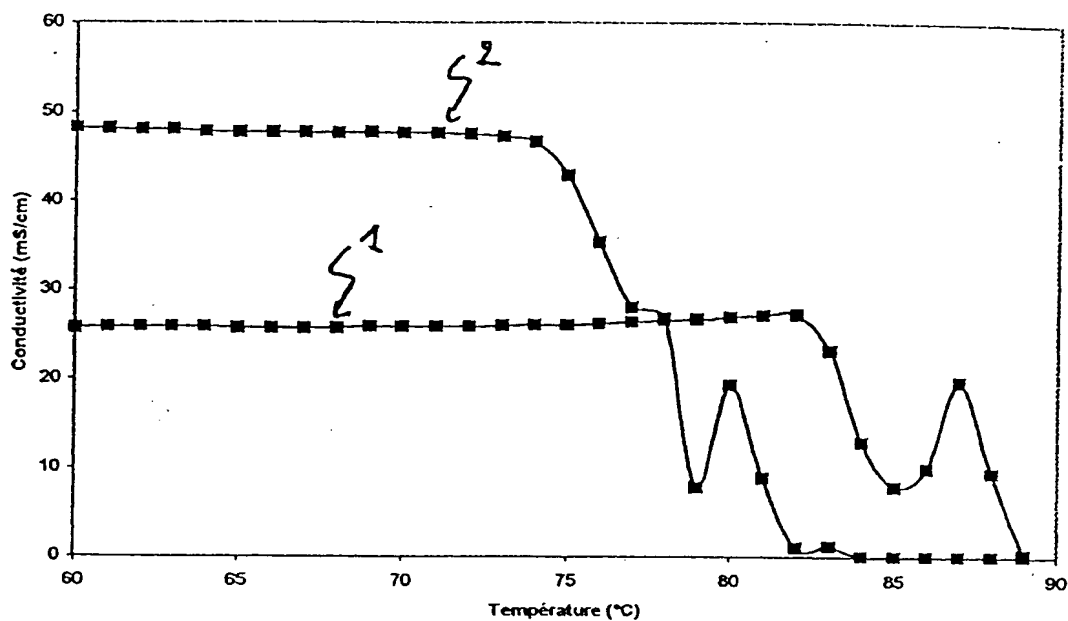
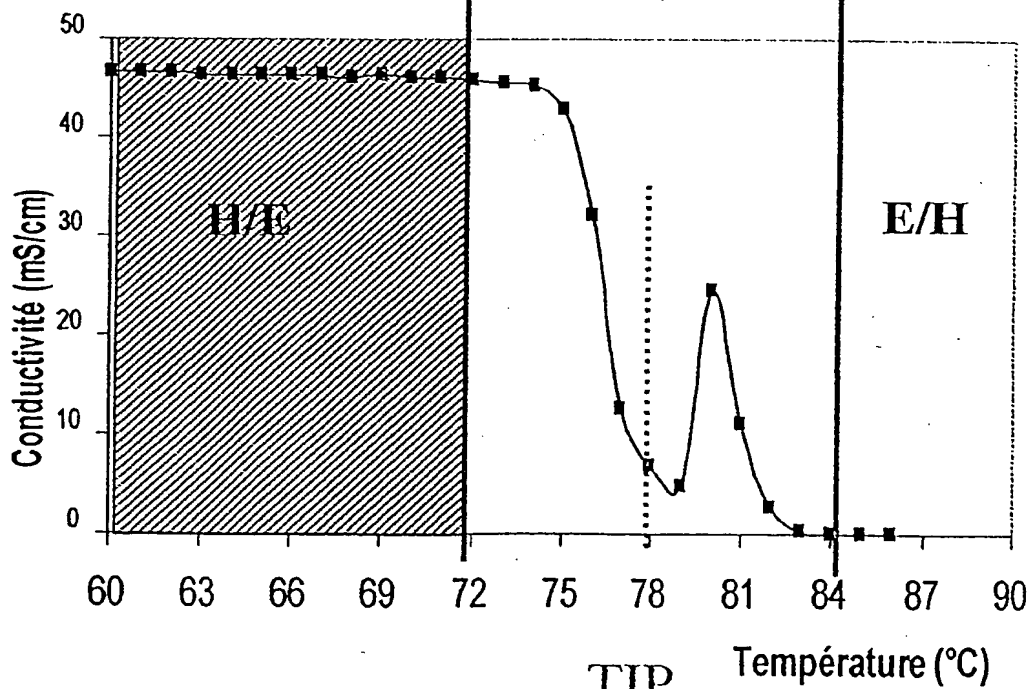


FIGURE 3



TIP
FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatir Application No
PCT/FR. 01/00621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01J13/00 B01F17/00 A61K9/51 B01J13/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01J B01F A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 692 167 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 17 December 1993 (1993-12-17) page 3, line 29 -page 7, line 14; examples 8,17,18 ---	1,12-21
X	US 5 174 930 A (STAINMESSE SERGE ET AL) 29 December 1992 (1992-12-29) column 2, line 65 -column 4, line 28; claims 1-13 ---	1-12
X	US 5 049 322 A (DEVISSAGUET JEAN-PHILIPPE ET AL) 17 September 1991 (1991-09-17) column 2, line 55 -column 4, line 25; claims 1,12 ---	1-12
X	EP 0 717 989 A (CUSI LAB) 26 June 1996 (1996-06-26) page 3, line 8 -page 4, line 25 ---	1-12
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2001

Date of mailing of the international search report

30/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willsher, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/FR 01/00621

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 529 711 A (CUSI LAB) 3 March 1993 (1993-03-03) page 3, line 11 -page 3, line 57; claims 1-18	1-12
X	EP 0 447 318 A (OREAL) 18 September 1991 (1991-09-18) page 3, line 18 -page 4, line 40	1-12
A	EP 0 621 073 A (CUSI LAB) 26 October 1994 (1994-10-26) the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/00621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2692167 A	17-12-1993	AT 132037 T	15-01-1996
		DE 69301150 D	08-02-1996
		DE 69301150 T	05-09-1996
		EP 0646002 A	05-04-1995
		ES 2083291 T	01-04-1996
		WO 9325194 A	23-12-1993
		JP 7507783 T	31-08-1995
US 5174930 A	29-12-1992	FR 2608942 A	01-07-1988
		FR 2634375 A	26-01-1990
		AT 74025 T	15-04-1992
		CA 1293170 A	17-12-1991
		DE 3777793 A	30-04-1992
		EP 0274961 A	20-07-1988
		ES 2031529 T	16-12-1992
		GR 3004198 T	31-03-1993
		JP 1960935 C	10-08-1995
		JP 6093998 B	24-11-1994
		JP 63232840 A	28-09-1988
		US 5049322 A	17-09-1991
		AT 85888 T	15-03-1993
		DE 68904999 D	01-04-1993
		DE 68904999 T	12-06-1997
		EP 0349429 A	03-01-1990
		ES 2054053 T	01-08-1994
		GR 3007265 T	30-07-1993
		GR 3022121 T	31-03-1997
		JP 2118858 C	06-12-1996
		JP 2149336 A	07-06-1990
		JP 8024840 B	13-03-1996
		KR 9614869 B	21-10-1996
US 5049322 A	17-09-1991	FR 2608942 A	01-07-1988
		AT 74025 T	15-04-1992
		CA 1293170 A	17-12-1991
		DE 3777793 A	30-04-1992
		EP 0274961 A	20-07-1988
		ES 2031529 T	16-12-1992
		GR 3004198 T	31-03-1993
		JP 1960935 C	10-08-1995
		JP 6093998 B	24-11-1994
		JP 63232840 A	28-09-1988
		US 5174930 A	29-12-1992
EP 0717989 A	26-06-1996	ES 2078190 A	01-12-1995
		AT 198548 T	15-01-2001
		AU 696400 B	10-09-1998
		AU 7537994 A	18-12-1995
		BG 100372 A	31-12-1996
		BR 9407333 A	18-06-1996
		DE 69426568 D	15-02-2001
		FI 961348 A	25-03-1996
		JP 9501101 T	04-02-1997
		NO 960232 A	19-03-1996
		US 5851452 A	22-12-1998
		CA 2167681 A	30-11-1995
		CN 1130868 A	11-09-1996
		WO 9531975 A	30-11-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/00621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0717989 A		PL 312666 A	29-04-1996
EP 0529711 A	03-03-1993	ES 2034891 B AT 150642 T DE 4128910 A JP 2542149 B JP 6057005 A US 5705196 A	16-12-1993 15-04-1997 11-02-1993 09-10-1996 01-03-1994 06-01-1998
EP 0447318 A	18-09-1991	FR 2659554 A AT 123219 T CA 2038331 A,C DE 69110070 D DE 69110070 T DK 447318 T ES 2072563 T JP 2676281 B JP 5148129 A US 6203802 B ZA 9101933 A	20-09-1991 15-06-1995 17-09-1991 06-07-1995 12-10-1995 02-10-1995 16-07-1995 12-11-1997 15-06-1993 20-03-2001 24-12-1991
EP 0621073 A	26-10-1994	ES 2070076 A AT 159186 T DE 69406178 D DE 69406178 T DK 621073 T GR 3025888 T JP 6343854 A JP 8015550 B US 5885491 A	16-05-1995 15-11-1997 20-11-1997 04-06-1998 02-06-1998 30-04-1998 20-12-1994 21-02-1996 23-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/00621

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 B01J13/00 B01F17/00 A61K9/51 B01J13/06		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 B01J B01F A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 692 167 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 17 décembre 1993 (1993-12-17) page 3, ligne 29 -page 7, ligne 14; exemples 8,17,18 ---	1,12-21
X	US 5 174 930 A (STAINMESSE SERGE ET AL) 29 décembre 1992 (1992-12-29) colonne 2, ligne 65 -colonne 4, ligne 28; revendications 1-13 ---	1-12
X	US 5 049 322 A (DEVISSAGUET JEAN-PHILIPPE ET AL) 17 septembre 1991 (1991-09-17) colonne 2, ligne 55 -colonne 4, ligne 25; revendications 1,12 ---	1-12
X	EP 0 717 989 A (CUSI LAB) 26 juin 1996 (1996-06-26) page 3, ligne 8 -page 4, ligne 25 --- -/--	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 mai 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">30/05/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Willsher, C</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/00621

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 529 711 A (CUSI LAB) 3 mars 1993 (1993-03-03) page 3, ligne 11 -page 3, ligne 57; revendications 1-18 ----	1-12
X	EP 0 447 318 A (OREAL) 18 septembre 1991 (1991-09-18) page 3, ligne 18 -page 4, ligne 40 ----	1-12
A	EP 0 621 073 A (CUSI LAB) 26 octobre 1994 (1994-10-26) le document en entier -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux n. de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 01/00621

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2692167	A	17-12-1993	AT	132037 T	15-01-1996
			DE	69301150 D	08-02-1996
			DE	69301150 T	05-09-1996
			EP	0646002 A	05-04-1995
			ES	2083291 T	01-04-1996
			WO	9325194 A	23-12-1993
			JP	7507783 T	31-08-1995
US 5174930	A	29-12-1992	FR	2608942 A	01-07-1988
			FR	2634375 A	26-01-1990
			AT	74025 T	15-04-1992
			CA	1293170 A	17-12-1991
			DE	3777793 A	30-04-1992
			EP	0274961 A	20-07-1988
			ES	2031529 T	16-12-1992
			GR	3004198 T	31-03-1993
			JP	1960935 C	10-08-1995
			JP	6093998 B	24-11-1994
			JP	63232840 A	28-09-1988
			US	5049322 A	17-09-1991
			AT	85888 T	15-03-1993
			DE	68904999 D	01-04-1993
			DE	68904999 T	12-06-1997
			EP	0349429 A	03-01-1990
			ES	2054053 T	01-08-1994
			GR	3007265 T	30-07-1993
			GR	3022121 T	31-03-1997
			JP	2118858 C	06-12-1996
JP	2149336 A	07-06-1990			
JP	8024840 B	13-03-1996			
KR	9614869 B	21-10-1996			
US 5049322	A	17-09-1991	FR	2608942 A	01-07-1988
			AT	74025 T	15-04-1992
			CA	1293170 A	17-12-1991
			DE	3777793 A	30-04-1992
			EP	0274961 A	20-07-1988
			ES	2031529 T	16-12-1992
			GR	3004198 T	31-03-1993
			JP	1960935 C	10-08-1995
			JP	6093998 B	24-11-1994
			JP	63232840 A	28-09-1988
US	5174930 A	29-12-1992			
EP 0717989	A	26-06-1996	ES	2078190 A	01-12-1995
			AT	198548 T	15-01-2001
			AU	696400 B	10-09-1998
			AU	7537994 A	18-12-1995
			BG	100372 A	31-12-1996
			BR	9407333 A	18-06-1996
			DE	69426568 D	15-02-2001
			FI	961348 A	25-03-1996
			JP	9501101 T	04-02-1997
			NO	960232 A	19-03-1996
			US	5851452 A	22-12-1998
			CA	2167681 A	30-11-1995
			CN	1130868 A	11-09-1996
			WO	9531975 A	30-11-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande No
PCT/FR 01/00621

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0717989 A		PL 312666 A	29-04-1996
EP 0529711 A	03-03-1993	ES 2034891 B AT 150642 T DE 4128910 A JP 2542149 B JP 6057005 A US 5705196 A	16-12-1993 15-04-1997 11-02-1993 09-10-1996 01-03-1994 06-01-1998
EP 0447318 A	18-09-1991	FR 2659554 A AT 123219 T CA 2038331 A,C DE 69110070 D DE 69110070 T DK 447318 T ES 2072563 T JP 2676281 B JP 5148129 A US 6203802 B ZA 9101933 A	20-09-1991 15-06-1995 17-09-1991 06-07-1995 12-10-1995 02-10-1995 16-07-1995 12-11-1997 15-06-1993 20-03-2001 24-12-1991
EP 0621073 A	26-10-1994	ES 2070076 A AT 159186 T DE 69406178 D DE 69406178 T DK 621073 T GR 3025888 T JP 6343854 A JP 8015550 B US 5885491 A	16-05-1995 15-11-1997 20-11-1997 04-06-1998 02-06-1998 30-04-1998 20-12-1994 21-02-1996 23-03-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.